

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 4 月 22 日 (22.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/033670 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 1/20, 1/21, C12P 7/62 (74) 代理人: 安富 康男, 外(YASUTOMI, Yasuo et al.); 〒532-0011 大阪府 大阪市 淀川区西中島 5 丁目 4 番 20 号 中央ビル Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013022
- (22) 国際出願日: 2003 年 10 月 10 日 (10.10.2003) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2002-297601
2002 年 10 月 10 日 (10.10.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 鐘淵化学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒530-8288 大阪府 大阪市 北区中之島 3 丁目 2 番 4 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中嶋 敏光 (NAKASHIMA, Toshimitsu) [JP/JP]; 〒676-0035 兵庫県 高砂市 高砂町清水町 1 4 5 5-1 Hyogo (JP). 小田原 修 (ODAWARA, Osamu) [JP/JP]; 〒676-0008 兵庫県 高砂市 荒井町新浜 2 丁目 2 1 番 8 号 Hyogo (JP). 横溝 聡 (YOKOMIZO, Satoru) [JP/JP]; 〒674-0092 兵庫県 明石市 二見町東二見 1 6 3 0 シーハイツ 201 号 Hyogo (JP).
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CULTURE METHOD OF CONTROLLING THE COMPOSITION OF COPOLYMER POLYESTER

(54) 発明の名称: 共重合ポリエステル組成をコントロールする培養方法

(57) Abstract: It is intended to develop a technique whereby the composition of a biodegradable copolymer polyester can be arbitrarily controlled while ensuring a high productivity at a low cost. Namely, a culture method for producing a copolymer polyester using a microorganism characterized in that the specific feeding speed of a fat to be used as a carbon source to a substrate is controlled at a definite level throughout the culture time or altered in the microbial cell growth phase and in the polyester accumulation phase during the culture but controlled at a definite level in each phase. A culture method of controlling the composition of a copolymer polyester product by appropriately selecting the type of a fat and/or the specific supplying speed of the fat to a substrate.

(57) 要約: 本発明の目的は、低コストで高生産性を確保しつつ、生分解性共重合ポリエステルの組成を任意に制御できる技術を開発することである。本発明は、微生物による共重合ポリエステルの生産において、炭素源として使用する油脂の比基質供給速度を、培養の全期間を通じて一定値に制御するか、又は、培養の菌体増殖期とポリエステル蓄積期とで変化させ、それぞれ期間中は一定値に制御することとを特徴とする培養方法である。また、本発明は、油脂の種類及び/又は油脂の比基質供給速度の制御値を選択することによって、生産される共重合ポリエステルの組成をコントロールする培養方法である。

明細書

共重合ポリエステル組成をコントロールする培養方法

技術分野

- 5 本発明は、微生物より生産される共重合ポリエステルの組成をコントロールする培養方法に関する。

背景技術

- 現在までに数多くの微生物において、エネルギー貯蔵物質としてポリエステル
10 を菌体内に蓄積することが知られている。その代表例がポリ-3-ヒドロキシ酪酸（以下、P（3HB）と略す）である。P（3HB）は熱可塑性高分子であり、自然環境中で生物的に分解されることから、環境にやさしいグリーンプラスチックとして注目されている。しかし、P（3HB）は結晶性が高いため、硬くて脆い性質を持っていることから実用的には応用範囲が限られる。この為、この性質
15 の改良を目的とした研究がなされてきた。

- その中で、3-ヒドロキシ酪酸（以下、3HBと略す）と3-ヒドロキシ吉草酸（以下、3HVと略す）からなる共重合体P（3HB-co-3HV）の製造方法が開発された（特開昭57-150393号公報；特開昭59-220192号公報；特表平11-500008号公報）。このP（3HB-co-3HV
20 ）はP（3HB）に比べると柔軟性に富むため、幅広い用途に応用できると考えられた。これらの特許文献における共重合体の製造方法は、従来のP（3HB）の製造方法と同様に、前段で菌体を増殖させ、後段で窒素又はリンを制限して微生物を培養し、共重合体を製造するものである。またP（3HB-co-3HV）については、3HVの含有率が増えるにつれて柔軟性が変化することから、3
25 HVの組成比を制御する研究もなされてきた。例えば、特開昭57-150393号公報や特開昭63-269989号公報ではプロピオン酸を使用し、また、特公平7-79705号公報ではプロパン-1-オールを使用し、それらの培地中への添加量を変えることにより3HVの含有率を変化させており、3HV含有率が10～90mol%のP（3HB-co-3HV）が製造されている。しか

しながら、実際のところP (3HB-co-3HV) は3HV含有率を増加させても、それに伴う物性の変化が乏しく、特にフィルム等に使用するのに要求される程には柔軟性が向上しないため、シャンプーボトルや使い捨て剃刀の取っ手等、硬質成型体の分野にしか利用されなかった。

- 5 このような状況下、上述の3HBと3HVの共重合体の欠点をカバーすることを目的とし、3HBと3HV以外のヒドロキシ酸、例えば、3-ヒドロキシプロピオン酸（以下、3HPと略す）、3-ヒドロキシヘキサン酸（以下、3HHと略す）、3-ヒドロキシオクタン酸（以下、3HOと略す）、3-ヒドロキシノナン酸（以下、3HNと略す）、3-ヒドロキシデカン酸（以下、3HDと略す）
- 10)、3-ヒドロキシドデカン酸（以下、3HDDと略す）等を構成要素として含む共重合ポリエステルが精力的に研究されている（P o i r i e r Y . , N a w r a t h C . , S o m e r v i l l e C , B I O / T E C H N O L O G Y , 1 3 , 1 4 2 - 1 5 0 , 1 9 9 5 年）。その中でも、注目すべきものとして、3HBと3HHを含む共重合ポリエステル、特に3HBと3HHのみからなる共重合
- 15 体P (3HB-co-3HH) と、その製造方法についての研究がある（特開平5-93049号公報；特開平7-265065号公報）。これらの特許文献のP (3HB-co-3HH) の製造方法は、土壌より単離されたアエロモナス・キャビエ (Aeromonas caviae) を用いて、オレイン酸等の脂肪酸やオリーブオイル等の油脂から発酵生産するものである。また、P (3HB
- 20 -co-3HH) の性質に関する研究もなされている（Y. Doi, S. Kitamura, H. Abe, *Macromolecules* 28, 4822-4823, 1995年）。この報告では炭素数が12個以上の脂肪酸を唯一の炭素源としてアエロモナス・キャビエ (A. caviae) を培養し、3HH含有率が11~19mol%のP (3HB-co-3HH) を発酵生産している。その
- 25 結果、このP (3HB-co-3HH) は、3HH含有率が増加するにしたがって、P (3HB) の硬くて脆い性質から次第に柔軟な性質を示すようになり、P (3HB-co-3HV) を上回る柔軟性を示すことが明らかにされた。

また、アエロモナス・キャビエ (A. caviae) のポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) シンターゼ遺伝子をクローニングし、この遺伝子を90%以上の

高ポリヒドロキシ酪酸 (PHB) 蓄積能を有するラルストニア・ユートロファ (R. eutropha) に導入した組換え株を用いて、脂肪酸を炭素源として P (3HB-co-3HH) を生産するとの報告がなされた (T. Fukui, Y. doi, J. Bacteriol., vol. 179, No. 15, 4821-4830, 1997年; 特開平10-108682号公報)。このなかで、オクタン酸ナトリウムを炭素源とすることで、3HH含有率が10~20mol%の P (3HB-co-3HH) が生産できると報告している。さらに、最近になって、上記組み換え株を用いてポリエステルを生産する際に、複数種の炭素源を用いる方法が開示され、炭素源として用いる油脂や脂肪酸の炭素数が、P (3HB-co-3HH) の3HH含有率に影響を与えることが明らかとなった (特開2001-340078号公報)。

今後、P (3HB-co-3HH) 等の共重合ポリエステルのモノマーユニットの組成比、特に3HH含有率を広い任意の範囲でコントロールして共重合体を製造することができれば、硬い共重合体から柔らかい共重合体まで発酵生産可能となり、テレビの筐体等のように硬さを要求されるものから、糸やフィルム等のような柔軟性を要求されるものまで、幅広い分野への応用が期待できると考えられている。

上述のように、P (3HB-co-3HH) 等の共重合ポリエステルについては、その組成比を任意に制御できる技術を確立することが実用化、商業化を実現する上で、また消費者の要求を満足する上で、この上なく重要となる。もうひとつ実用化の障壁となっているのは生産コストの問題である。それに対し、従来の共重合ポリエステルの製造方法においては、3HB以外のモノマーユニットを共重合させるために、あるいはその含有率を高めるために、高価な特定の脂肪酸を培地中に添加する必要があった (特表平11-500008号公報; 特開2001-340078号公報)。さらに、P (3HB-co-3HH) の場合は、既に開示されているいずれの方法においても菌体の生産性が低く、また3HH含有率を向上させようとする高価な炭素源が必要となるばかりでなくさらに生産性が低下する傾向があり、従来の方法は本ポリマーの実用化に向けた生産方法としては適用できない。上述したように、共重合ポリエステルについてはそのモノマ

一ユニットの組成比を制御することが幅広い分野へ応用するために必要不可欠である。そこで低コストで高い菌体生産性とポリマー含量を実現し、かつ共重合ポリエステルの組成を任意に制御することができる生産方法の開発が待望されていた。

5

発明の要約

本発明は、上記現状に鑑み、生分解性共重合ポリエステルの組成を制御でき、かつ低コストで、高い生産性を実現する生産方法を提供するものである。

本発明者らは様々な検討を行い、特に発酵原料に関しては、価格、供給安定性、品質の安定性、菌体あるいはポリマーの収率等を検討した結果、共重合ポリエ
10 テルを蓄積する微生物を、安価な油脂を炭素源とする培地を使用して培養し、高い生産性を保持しつつ、かつ、炭素源として特に高価な脂肪酸等を使用しなくてもモノマー組成を任意の範囲内に良好に制御することに成功した。

すなわち、本発明の要旨は、微生物を用いて共重合ポリエステルを生産する際
15 に、炭素源として使用する油脂の比基質供給速度を、培養の全期間を通じて一定値に制御する、又は、培養期間を菌体増殖期とポリエステル蓄積期の2つのフェーズに分けてそれぞれのフェーズで一定値に制御する培養方法に関する。さらに、油脂の種類及び／又は油脂の比基質供給速度の制御値を選択することによって、生産される共重合ポリエステルの組成を任意にコントロールする培養方法に関す
20 る。

発明の詳細な開示

以下に、本発明を詳細に説明する。

本発明の共重合ポリエステルの組成をコントロールする培養方法は、微生物に
25 よる共重合ポリエステルの生産において、炭素源として使用する油脂の比基質供給速度を、培養の全期間を通じて一定値に制御する、又は、培養の菌体増殖期とポリエステル蓄積期とで変化させ、それぞれ期間中は一定値に制御することを特徴とする培養方法である。このように、当該培養方法は、微生物を用いて生分解性の共重合ポリエステルを生産する際に適用される。

本発明の培養方法が適用できる共重合ポリエステルとしては、特に限定されず、少なくとも2種のモノマーユニットを重合して得られる共重合ポリエステルである。当該共重合ポリエステルとしては、具体的には、3HBと3HHからなる共重合ポリエステルP (3HB-co-3HH) や、3HBと3HHと3HVの3成分からなる共重合体、その他シュードモナス (Pseudomonas) 属細菌によって生産される3HB、3HH、3HO、3HD、3HDD等の多くの成分をその構成要素として含む共重合体を、その代表的なものとして挙げる事ができる (I. K. P. Tan, K. S. Kumar, M. Theanmalar, S. N. Gan, B. Gordon III, Appl. Microbiol. Biotechnol., 47, 207-211, 1997; R. D. Ashby, T. A. Foglia, Appl. Microbiol. Biotechnol., 49, 431-437, 1998)。この中でも、共重合ポリエステルのモノマーユニットの組成比、特に3HHの含有率が変化することにより、非常に幅広くポリエステルの特性が変化するという点で、そのモノマーユニットの一つとして3HHを含む共重合体が好ましく、P (3HB-co-3HH) がより好ましい。

本発明の培養方法において、使用する微生物としては特に制限はなく、天然から単離された微生物や、菌株の寄託機関 (例えばIFO、ATCC等) に寄託されている微生物等を使用できる。具体的には、アルカリゲネス (Alcaligenes) 属、ラルストニア (Ralstonia) 属、アエロモナス (Aeromonas) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、エシェリキア (Escherichia) 属等の細菌類を使用することができる。

また、上記微生物が、野生型の状態では目的とする共重合体を生産できない、もしくはその生産量が低い場合には、上記微生物に、目的とする共重合ポリエステルの重合酵素遺伝子を導入して形質転換し、得られた形質転換微生物を用いることができる。形質転換微生物を作製する場合、ポリエステル重合酵素遺伝子を含む組換えベクターを利用する等の一般的な方法を用いることができ、該ベクターには、その菌体内で自律的に増殖しうるプラスミドベクターを用いることができる。また、該ポリエステル重合酵素遺伝子を直接宿主の染色体に組み込んでも

良く、宿主としては、アルカリゲネス (Alcaligenes) 属、ラルストニア (Ralstonia) 属、アエロモナス (Aeromonas) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、エシェリキア (Escherichia) 属等の細菌類を用いることができる。

- 5 本発明の共重合ポリエステルの生産において使用されるポリエステル重合酵素遺伝子としては、特に限定されないが、アエロモナス・キャビエ (Aeromonas caviae) より単離された遺伝子が好ましく、例えば、特開平10-108682号公報に記載されている遺伝子断片を用いることができる。

- また、微生物に組換えベクターを導入するには、公知の方法により行うことができる。例えば、接合法、カルシウム法やエレクトロポレーション法等を用いることができる。

- 本発明に用いられる微生物の一例として、ラルストニア・ユートロファ (Ralstonia eutropha) に、アエロモナス・キャビエ (Aeromonas caviae) 由来のポリエステル重合酵素遺伝子を導入した、Ralstonia eutropha PHB-4/pJRDEE32d13株 (T. Fukui, Y. Doi, Appl. Microbiol. Biotechnol., 49, 333-336, 1998) を好ましく用いることができる。

- 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1060 1061 1062 1063 1064 1065 1066 1067 1068 1069 1070 1071 1072 1073 1074 1075 1076 1077 1078 1079 1080 1081 1082 1083 1084 1085 1086 1087 1088 1089 1090 1091 1092 1093 1094 1095 1096 1097 1098 1099 1100 1101 1102 1103 1104 1105 1106 1107 1108 1109 1110 1111 1112 1113 1114 1115 1116 1117 1118 1119 1120 1121 1122 1123 1124 1125 1126 1127 1128 1129 1130 1131 1132 1133 1134 1135 1136 1137 1138 1139 1140 1141 1142 1143 1144 1145 1146 1147 1148 1149 1150 1151 1152 1153 1154 1155 1156 1157 1158 1159 1160 1161 1162 1163 1164 1165 1166 1167 1168 1169 1170 1171 1172 1173 1174 1175 1176 1177 1178 1179 1180 1181 1182 1183 1184 1185 1186 1187 1188 1189 1190 1191 1192 1193 1194 1195 1196 1197 1198 1199 1200 1201 1202 1203 1204 1205 1206 1207 1208 1209 1210 1211 1212 1213 1214 1215 1216 1217 1218 1219 1220 1221 1222 1223 1224 1225 1226 1227 1228 1229 1230 1231 1232 1233 1234 1235 1236 1237 1238 1239 1240 1241 1242 1243 1244 1245 1246 1247 1248 1249 1250 1251 1252 1253 1254 1255 1256 1257 1258 1259 1260 1261 1262 1263 1264 1265 1266 1267 1268 1269 1270 1271 1272 1273 1274 1275 1276 1277 1278 1279 1280 1281 1282 1283 1284 1285 1286 1287 1288 1289 1290 1291 1292 1293 1294 1295 1296 1297 1298 1299 1300 1301 1302 1303 1304 1305 1306 1307 1308 1309 1310 1311 1312 1313 1314 1315 1316 1317 1318 1319 1320 1321 1322 1323 1324 1325 1326 1327 1328 1329 1330 1331 1332 1333 1334 1335 1336 1337 1338 1339 1340 1341 1342 1343 1344 1345 1346 1347 1348 1349 1350 1351 1352 1353 1354 1355 1356 1357 1358 1359 1360 1361 1362 1363 1364 1365 1366 1367 1368 1369 1370 1371 1372 1373 1374 1375 1376 1377 1378 1379 1380 1381 1382 1383 1384 1385 1386 1387 1388 1389 1390 1391 1392 1393 1394 1395 1396 1397 1398 1399 1400 1401 1402 1403 1404 1405 1406 1407 1408 1409 1410 1411 1412 1413 1414 1415 1416 1417 1418 1419 1420 1421 1422 1423 1424 1425 1426 1427 1428 1429 1430 1431 1432 1433 1434 1435 1436 1437 1438 1439 1440 1441 1442 1443 1444 1445 1446 1447 1448 1449 1450 1451 1452 1453 1454 1455 1456 1457 1458 1459 1460 1461 1462 1463 1464 1465 1466 1467 1468 1469 1470 1471 1472 1473 1474 1475 1476 1477 1478 1479 1480 1481 1482 1483 1484 1485 1486 1487 1488 1489 1490 1491 1492 1493 1494 1495 1496 1497 1498 1499 1500 1501 1502 1503 1504 1505 1506 1507 1508 1509 1510 1511 1512 1513 1514 1515 1516 1517 1518 1519 1520 1521 1522 1523 1524 1525 1526 1527 1528 1529 1530 1531 1532 1533 1534 1535 1536 1537 1538 1539 1540 1541 1542 1543 1544 1545 1546 1547 1548 1549 1550 1551 1552 1553 1554 1555 1556 1557 1558 1559 1560 1561 1562 1563 1564 1565 1566 1567 1568 1569 1570 1571 1572 1573 1574 1575 1576 1577 1578 1579 1580 1581 1582 1583 1584 1585 1586 1587 1588 1589 1590 1591 1592 1593 1594 1595 1596 1597 1598 1599 1600 1601 1602 1603 1604 1605 1606 1607 1608 1609 1610 1611 1612 1613 1614 1615 1616 1617 1618 1619 1620 1621 1622 1623 1624 1625 1626 1627 1628 1629 1630 1631 1632 1633 1634 1635 1636 1637 1638 1639 1640 1641 1642 1643 1644 1645 1646 1647 1648 1649 1650 1651 1652 1653 1654 1655 1656 1657 1658 1659 1660 1661 1662 1663 1664 1665 1666 1667 1668 1669 1670 1671 1672 1673 1674 1675 1676 1677 1678 1679 1680 1681 1682 1683 1684 1685 1686 1687 1688 1689 1690 1691 1692 1693 1694 1695 1696 1697 1698 1699 1700 1701 1702 1703 1704 1705 1706 1707 1708 1709 1710 1711 1712 1713 1714 1715 1716 1717 1718 1719 1720 1721 1722 1723 1724 1725 1726 1727 1728 1729 1730 1731 1732 1733 1734 1735 1736 1737 1738 1739 1740 1741 1742 1743 1744 1745 1746 1747 1748 1749 1750 1751 1752 1753 1754 1755 1756 1757 1758 1759 1760 1761 1762 1763 1764 1765 1766 1767 1768 1769 1770 1771 1772 1773 1774 1775 1776 1777 1778 1779 1780 1781 1782 1783 1784 1785 1786 1787 1788 1789 1790 1791 1792 1793 1794 1795 1796 1797 1798 1799 1800 1801 1802 1803 1804 1805 1806 1807 1808 1809 1810 1811 1812 1813 1814 1815 1816 1817 1818 1819 1820 1821 1822 1823 1824 1825 1826 1827 1828 1829 1830 1831 1832 1833 1834 1835 1836 1837 1838 1839 1840 1841 1842 1843 1844 1845 1846 1847 1848 1849 1850 1851 1852 1853 1854 1855 1856 1857 1858 1859 1860 1861 1862 1863 1864 1865 1866 1867 1868 1869 1870 1871 1872 1873 1874 1875 1876 1877 1878 1879 1880 1881 1882 1883 1884 1885 1886 1887 1888 1889 1890 1891 1892 1893 1894 1895 1896 1897 1898 1899 1900 1901 1902 1903 1904 1905 1906 1907 1908 1909 1910 1911 1912 1913 1914 1915 1916 1917 1918 1919 1920 1921 1922 1923 1924 1925 1926 1927 1928 1929 1930 1931 1932 1933 1934 1935 1936 1937 1938 1939 1940 1941 1942 1943 1944 1945 1946 1947 1948 1949 1950 1951 1952 1953 1954 1955 1956 1957 1958 1959 1960 1961 1962 1963 1964 1965 1966 1967 1968 1969 1970 1971 1972 1973 1974 1975 1976 1977 1978 1979 1980 1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1988 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100 2101 2102 2103 2104 2105 2106 2107 2108 2109 2110 2111 2112 2113 2114 2115 2116 2117 2118 2119 2120 2121 2122 2123 2124 2125 2126 2127 2128 2129 2130 2131 2132 2133 2134 2135 2136 2137 2138 2139 2140 2141 2142 2143 2144 2145 2146 2147 2148 2149 2150 2151 2152 2153 2154 2155 2156 2157 2158 2159 2160 2161 2162 2163 2164 2165 2166 2167 2168 2169 2170 2171 2172 2173 2174 2175 2176 2177 2178 2179 2180 2181 2182 2183 2184 2185 2186 2187 2188 2189 2190 2191 2192 2193 2194 2195 2196 2197 2198 2199 2200 2201 2202 2203 2204 2205 2206 2207 2208 2209 2210 2211 2212 2213 2214 2215 2216 2217 2218 2219 2220 2221 2222 2223 2224 2225 2226 2227 2228 2229 2230 2231 2232 2233 2234 2235 2236 2237 2238 2239 2240 2241 2242 2243 2244 2245 2246 2247 2248 2249 2250 2251 2252 2253 2254 2255 2256 2257 2258 2259 2260 2261 2262 2263 2264 2265 2266 2267 2268 2269 2270 2271 2272 2273 2274 2275 2276 2277 2278 2279 2280 2281 2282 2283 2284 2285 2286 2287 2288 2289 2290 2291 2292 2293 2294 2295 2296 2297 2298 2299 2300 2301 2302 2303 2304 2305 2306 2307 2308 2309 2310 2311 2312 2313 2314 2315 2316 2317 2318 2319 2320 2321 2322 2323 2324 2325 2326 2327 2328 2329 2330 2331 2332 2333 2334 2335 2336 2337 2338 2339 2340 2341 2342 2343 2344 2345 2346 2347 2348 2349 2350 2351 2352 2353 2354 2355 2356 2357 2358 2359 2360 2361 2362 2363 2364 2365 2366 2367 2368 2369 2370 2371 2372 2373 2374 2375 2376 2377 2378 2379 2380 2381 2382 2383 2384 2385 2386 2387 2388 2389 2390 2391 2392 2393 2394 2395 2396 2397 2398 2399 2400 2401 2402 2403 2404 2405 2406 2407 2408 2409 2410 2411 2412 2413 2414 2415 2416 2417 2418 2419 2420 2421 2422 2423 2424 2425 2426 2427 2428 2429 2430 2431 2432 2433 2434 2435 2436 2437 2438 2439 2440 2441 2442 2443 2444 2445 2446 2447 2448 2449 2450 2451 2452 2453 2454 2455 2456 2457 2458 2459 2460 2461 2462 2463 2464 2465 2466 2467 2468 2469 2470 2471 2472 2473 2474 2475 2476 2477 2478 2479 2480 2481 2482 2483 2484 2485 2486 2487 2488 2489 2490 2491 2492 2493 2494 2495 2496 2497 2498 2499 2500 2501 2502 2503 2504 2505 2506 2507 2508 2509 2510 2511 2512 2513 2514 2515 2516 2517 2518 2519 2520 2521 2522 2523 2524 2525 2526 2527 2528 2529 2530 2531 2532 2533 2534 2535 2536 2537 2538 2539 2540 2541 2542 2543 2544 2545 2546 2547 2548 2549 2550 2551 2552 2553 2554 2555 2556 2557 2558 2559 2560 2561 2562 2563 2564 2565 2566 2567 2568 2569 2570 2571 2572 2573 2574 2575 25

的な有機栄養源を含む培地が使用できる。窒素源としては、例えば、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩等の無機窒素源；ペプトン、肉エキス、酵母エキス等の有機窒素源が挙げられる。無機塩類としては、例えば、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸5 マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。ビタミン類としては、例えば、ビタミンB 1、ビタミンB 1 2、ビタミンC等が挙げられる。その他の有機栄養源としては、例えば、グリシン、アラニン、セリン、スレオニン、プロリン等のアミノ酸等が挙げられる。しかしながら、生産コスト抑制の観点からは、ペプトン、肉エキス、酵母エキス等の有機窒素源；グリシン、アラニン、10 セリン、スレオニン、プロリン等のアミノ酸；ビタミンB 1、ビタミンB 1 2、ビタミンC等のビタミン類の使用は最少量とする方が好ましい。特に、高価な有機窒素源であるペプトン、酵母エキス、肉エキス等の使用は最少量に留める方が好ましい。

一般に、微生物によるポリエステルの生産は、窒素やリン等の、増殖に必要な15 栄養素をある程度制限した条件下で好ましく達成される。本発明においても、そのような栄養制限を行うことができ、そのなかでも、窒素又はリンを制限するのがより好ましく、窒素は制限せずにリンを制限するのがさらに好ましい。なお、リンを制限するというのは、培地中にリン原子を全く含まないということではなく、増殖に必要とされる栄養源としてのリンが最低限含まれているということであり、すなわち菌体の増殖量がリンによって規定されている状態をいうのであつて、20 培地中に無機塩として少量含まれるものを排除するものではない。

本発明において炭素源として使用する油脂としては、大豆油、コーン油、綿実油、パーム油、パーム核油、ヤシ油、落花生油等の比較的安定的に供給される天然油脂；これらの油脂を分別して得られる各画分（例えば、パームWオレイン油25 （パーム油を2回無溶媒分別した低融点画分）、パーム核油オレイン（パーム核油を1回無溶媒分別した低融点画分）等）である分別油脂；これら天然油脂やその画分を化学的あるいは生物化学的に処理した合成油；さらにはこれらを混合した混合油等が使用できる。このなかでも、天然油脂、分別油脂が好ましく、コストの点からは天然油脂や安価な分別油脂を使用するのがより好ましい。

ここで、使用する油脂の種類を適宜選択することによって、共重合ポリエステルを構成するモノマーユニットの種類やその組成比を制御することができる。例えば、3HHを含む共重合ポリエステルの生産において、3HH含有率の高い共重合ポリエステルの得たい場合には、油脂の構成脂肪酸としてラウリン酸を含有する油脂、俗にラウリン油脂と称される油脂を使用することが好ましい。構成脂肪酸としてラウリン酸を含有する油脂としては、パーム核油やヤシ油等の天然油脂、パーム核油オレイン等の分別油脂や、それらラウリン油脂を含む混合油等が挙げられる。

さらに具体的にP(3HB-co-3HH)の場合を説明すると、ラウリン系の油脂を用いた場合、4~20mol%の比較的高い3HH含有率を有するP(3HB-co-3HH)を得ることができ、大豆油、コーン油、綿実油、パーム油、落花生油あるいはこれらの分別油脂等を用いた場合は1~10mol%の比較的低い3HH含有率のP(3HB-co-3HH)が得られる。さらにこれらの油脂を2種類あるいはそれ以上混合した油脂を用い、その混合割合を任意に変化させることで、P(3HB-co-3HH)の3HH含有率を任意にコントロールできる。

また、炭素源として使用する油脂が、その構成脂肪酸としてラウリン酸を含む油脂であり、かつリン制限下で培養することが特に好ましい。

一般に、微生物の培養において油脂を添加する場合、その添加方法としては、一度に大量に添加する、分割して添加する、連続的にあるいは間欠的に流加する等の方法が考えられるが、本発明者の検討結果によれば、一度に多量添加すると生成する脂肪酸により細胞毒性が現れたり、脂肪酸に起因する発泡が激しくなり、実際のオペレーションが困難な状況に陥ることがあることが判った。したがって、本発明においては、炭素源である油脂を、ポンプ等を使用して連続流加あるいは間欠流加する方法を採択する。本発明者らが炭素源である油脂の最適な添加方法を検討した結果、その流加方法を工夫することにより、発泡等の操作上の問題を回避するばかりではなく、生産される共重合ポリエステルの組成をも制御できることを見いだした。以下、本発明の培養方法で実施される油脂の流加方法について具体的に記述する。

本発明の培養方法において、炭素源である油脂は、その比基質供給速度が、培養の全期間を通じて、又は、培養の菌体増殖期とポリエステル蓄積期のそれぞれのフェーズ期間内で、ほぼ一定値となるよう流加される。

ここで、比基質供給速度とは、単位時間に正味の菌体重量あたり供給される油脂の量、つまり、正味の菌体重量あたりの油脂流加速度として定義される培養変数である。また、正味の菌体重量とは、全菌体重量から含有するポリエステル重量を差し引いた菌体重量（乾燥菌体重量）である。すなわち、比基質供給速度は以下の式（１）より求められる値である。

$$\begin{aligned} \text{比基質供給速度} &= \text{油脂流加速度 (g/h)} / \text{正味の菌体重量 (g)} \\ &= \text{単位時間あたりの油脂の供給量 (g/h)} / \\ &\quad (\text{全菌体重量 (g)} - \text{ポリエステル含有量 (g)}) \end{aligned}$$

本発明において、比基質供給速度を設定し、それを一定値に制御するためには正味の菌体重量の変化を予測する必要がある。本発明者らは正味の菌体重量の変化について鋭意検討した結果、実用に耐えうる正味の菌体の増殖曲線を予備実験を通じて推定することに成功し、本発明を完成するに至った。

本発明者らの検討結果によれば、発泡を抑制し、安定した培養を実現できる油脂の流加速度範囲では、培養液中に存在する油脂のホールドアップ（全培養液量（培地＋菌体＋油脂）に占める油脂の容積割合）は１０％以下と小さく、攪拌条件と通気条件によって決定される油脂の液滴径には大きな変化は見られない。したがって、液滴界面積に支配される基質の取り込み速度にも大きな差がなく、結果的に油脂の種類及び他の培養条件が同じであれば、正味の菌体重量の変化は、安定運転可能な油脂の流加速度範囲では、ほぼひとつの増殖曲線で近似して差し支えないと考えられる。

また、生分解性ポリエステルの生産は、後述するように窒素あるいはリンを制限した培養条件下で行われるので、窒素あるいはリンが枯渇した後は、正味の菌体量はほとんど変化せず、一定となる。したがって、油脂の種類と培養条件が決まれば、その条件下で油脂の流加速度を、油脂供給が不十分とならず、また過剰供給にならない範囲内で適当に変化させ（実操作では培養上清中の油脂層の厚さを観察しながら流加速度を調整する）、正味の菌体量の変化のデータを採取すれ

ば良い。このようにして正味の菌体の増殖曲線を得ることができる。それを基本に、比基質供給速度が培養の全期間、又は、上記特定のフェーズ期間内では設定されたある一定値となるように、上記式（１）に基づいて油脂の流加速度を計算し、その計算結果にしたがって、油脂の流加速度を連続的（段階的）あるいは間欠的に変化させて流加すればよい。

また、間接的な方法としては、通気排ガス中の酸素濃度、二酸化炭素濃度を測定して、酸素消費速度あるいは二酸化炭素発生速度から正味の菌体量を推定してリアルタイムで比基質供給速度を制御することもできる。しかしながら、本発明者らの検討結果によれば、窒素あるいはリンが枯渇していない菌体増殖期と枯渇後のポリエステル蓄積期では上述の呼吸特性に大きな変化が認められるため、予め増殖期及び生産期の呼吸特性を詳細に調べておくことが好ましい。

本発明において、油脂の比基質供給速度を一定値に制御する場合、培養の全期間を通じて油脂の比基質供給速度をある一定値に制御する方法と、培養全期間を菌体増殖期とポリエステル蓄積期の２つのフェーズに分け、それぞれのフェーズにおいて異なる比基質供給速度の値を設定し、それぞれのフェーズ期間内では設定された一定の比基質供給速度となるように制御する方法の２通りがあり、どちらの方法を用いても構わない。油脂の比基質供給速度を、培養の全期間中あるいは培養の特定のフェーズ期間内、一定値に制御するためには、設定された比基質供給速度の値を満たすように油脂の流加速度を連続的（段階的）にあるいは間欠的に変化させる必要がある。

油脂の流加速度を連続的（段階的）に変化させるには、例えばコンピューターを利用して流加速度を制御することができる。また、間欠的あるいは段階的に変化させる場合は、自動で制御することもできるが、手動でも流加速度の操作が可能である点で、簡便である。間欠的あるいは段階的に変化させる場合、厳密には予め設定された比基質供給速度の値を常に完全に満たすわけではないが、その平均値として上記設定された比基質供給速度の値を満たしていればよい。

このように、油脂の比基質供給速度を、培養の全期間、又は、培養の特定のフェーズ期間内で、設定されたある一定値となるように制御する本発明の培養方法により、培養初期に所定量の油脂を全量添加したり、培養期間中一定の油脂流加

量で流加培養したり、比基質供給速度に基づかず経験的に油脂の添加量を変化させるといった従来の培養方法では不十分であった、共重合ポリエステルの生産性の向上とモノマーユニットの組成比の制御が初めて達成される。

本明細書において、培養全期間というのは、ポリエステル生産のための本培養
5 における培養開始から培養終了時までの全期間のことである。また、比基質供給速度が培養全期間を通じて一定値となるように制御するというのは、すなわち菌体増殖期とポリエステル蓄積期の両方の期間で同じ一定値の比基質供給速度を選択してその値となるように油脂の流加速度を制御するということである。ここでいう、培養の菌体増殖期やポリエステル蓄積期というのは、培養期間を大きく2
10 つのフェーズに分けた場合の、それぞれ、培地中に窒素あるいはリンが十分量存在し、菌体増殖が活発に行われ、ポリエステルの蓄積速度がそれほど大きくない前半のフェーズ（菌体増殖期）と、培地中の窒素あるいはリンの濃度が低下し、菌体増殖が制限され、ポリエステルの蓄積速度が大きくなった後半のフェーズ（ポリエステル蓄積期）である。それぞれの培養フェーズによって異なる比基質供給速度の値を設定し、各フェーズの期間内では比基質供給速度をその設定された
15 一定値に制御して培養することによって、共重合ポリエステルの生産性の向上と、モノマーユニットの組成比の制御をより効率的に行うことができる。

本発明の方法で適用される油脂の比基質供給速度の範囲は、使用する油脂の種類や培養のフェーズにもよるが、おおむね $0.05 \sim 0.20 \text{ (g ; 油脂)} \times \text{(g ; 正味乾燥菌体重量)}^{-1} \times \text{(h ; 時間)}^{-1}$ 、好ましくは $0.06 \sim 0.15$
20 $\text{(g ; 油脂)} \times \text{(g ; 正味乾燥菌体重量)}^{-1} \times \text{(h ; 時間)}^{-1}$ 、より好ましくは $0.07 \sim 0.12 \text{ (g ; 油脂)} \times \text{(g ; 正味乾燥菌体重量)}^{-1} \times \text{(h ; 時間)}^{-1}$ である。

本発明において、比基質供給速度が小さいほど P (3HB-co-3HH) の
25 3HH含有率が上昇することが初めて見いだされた。従って、3HH含有率の高い P (3HB-co-3HH) を得たい場合には、比基質供給速度を低く（例えば $0.06 \sim 0.08 \text{ (g ; 油脂)} \times \text{(g ; 正味乾燥菌体重量)}^{-1} \times \text{(h ; 時間)}^{-1}$ ）設定して培養すればよい。また、培養のフェーズによって比基質供給速度を変化させる場合には、培養前半の菌体増殖期における比基質供給速度の値

- を高め（例えば $0.09 \sim 0.13$ (g ; 油脂) \times (g ; 正味乾燥菌体重量) $^{-1} \times$ (h ; 時間) $^{-1}$ ）に、培養後半のポリエステル蓄積期における比基質供給速度の値を低め（例えば $0.06 \sim 0.08$ (g ; 油脂) \times (g ; 正味乾燥菌体重量) $^{-1} \times$ (h ; 時間) $^{-1}$ ）に設定することで、共重合ポリエステルの生産性を低下させることなく、より効率的に 3HH 含有率を向上させることができる。

- また、上述したように、油脂の種類を適宜選択することでも、生産される共重合ポリエステルの組成を制御することが可能である。従って、油脂の種類、あるいは油脂の比基質供給速度の制御値を変えることにより、さらには両者の適切な組み合わせを選択することにより、生産される共重合ポリエステルの組成、例えば P (3HB-co-3HH) の 3HH 含有率等を、所望の組成やその割合に制御することが可能となる。

培養温度は、その菌の生育可能な温度であればよいが、 $20 \sim 40^{\circ}\text{C}$ が好ましく、より好ましくは $25 \sim 35^{\circ}\text{C}$ である。培養時間としては、特に制限はないが、1～7 日程度で良く、好ましくは $40 \sim 70$ 時間である。

- 以上説明したポリエステル生産の際の、比基質供給速度の制御、油脂の種類の選択や、窒素又はリンの制限等は、ポリエステル生産培地での本培養で行うものである。なお、ポリエステル生産培地での本培養の前に、菌体をある程度まで増殖させておくために、通常、種培地や前培養培地であらかじめ培養する。その場合には、種培地や前培養培地で用いる栄養源等は上述と同様のものを用いることができ、これら培地での培養温度はそれぞれ上記ポリエステル生産培地での本培養と同程度でよく、培養時間はそれぞれ好ましくは 1～2 日である。

また、形質転換微生物を使用する際は、例えば前培養培地で培養中に、ベクターに存在する耐性遺伝子に対応するカナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を添加しても良い。

- 本発明において、共重合ポリエステルを微生物菌体から回収する方法としては特に限定されず、公知の溶媒抽出法、物理的破碎法、化学的处理等が採用でき、例えば、次のような方法が使用できる。培養終了後、遠心分離器等を用いて、培養液から菌体を分離し、その菌体を蒸留水及びメタノール等により洗浄した後、乾燥させる。この乾燥菌体から、クロロホルム等の有機溶剤を用いてポリエステ

ルを抽出する。このポリエステルを含んだ有機溶剤溶液から、濾過等によって菌体成分を除去し、そのろ液にメタノールやヘキサン等の貧溶媒を加えてポリエステルを沈殿させる。濾過や遠心分離によって上澄み液を除去し、乾燥させてポリエステルを回収する。

- 5 得られたポリエステルのモノマーユニットの分析は、例えば、ガスクロマトグラフ法や核磁気共鳴法等により行う。

図面の簡単な説明

- 10 図1は、パーム核油オレインを用いた2回の予備実験における、単位培養液量あたりの正味の乾燥菌体重量 (g/L) の実測値 (図中の▲、◆) の変化と、それより求められる単位培養液量あたりの正味の乾燥菌体重量の増殖曲線を示す図である。

- 15 図2は、比基質供給速度を $0.09 \text{ (g ; 油脂)} \times \text{(g ; 正味乾燥菌体重量)}^{-1} \times \text{(h ; 時間)}^{-1}$ に設定した場合の、パーム核油オレインの単位培養液量あたりの流加速度 (g oil/h) L の理論値 (点線) と、実際に実施例で流加した油脂の単位培養液量あたりの流加速度の段階的な変化パターン (実線) を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- 20 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。以下の実施例においては、いずれも共重合ポリエステルとして、P (3HB-co-3HH) を生産した。もちろん本発明はこれら実施例にその技術範囲を限定するものではなく、P (3HB-co-3HH) の生産に限られるものではない。

- 25 例えば、用いる微生物やポリエステル重合酵素遺伝子の種類を変えたり、炭素源として他の油脂を用いたり、特定の脂肪酸を添加することによって、P (3HB-co-3HH) 以外の他の共重合体を生産することが可能である。

なお、下記の各表において、比基質供給速度の単位は、特に断りのない限り、 $\text{(g ; 油脂)} \times \text{(g ; 正味乾燥菌体重量)}^{-1} \times \text{(h ; 時間)}^{-1}$ とする。

(実施例1)

Ralstonia eutropha PHB-4/pJRDEE32d1
3株 (T. Fukui, Y. Doi, Appl. Microbiol. Biotechnol., 49, 333-336, 1998) (以下、Red13株と略
5 す) を次のように培養した。なお、Red13株は、*Alcaligenes eutrophus* AC32の名称で、FERM BP-6038の受託番号にて、平成9年8月7日付で、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6にある独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに、ブダペスト条約に基づいて国際寄託されている。

- 10 種培地の組成は、1w/v% Meat-extract、1w/v% Bacto-Trypton、0.2w/v% Yeast-extract、0.9w/v% $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.15w/v% KH_2PO_4 、(pH6.8) とした。

- 前培養培地の組成は、1.1w/v% $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.19w
15 /v% KH_2PO_4 、1.29w/v% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1w/v% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.5w/v% パームWオレイン油、0.5v/v% 微量金属塩溶液 (0.1N塩酸に1.6w/v% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1w/v% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.02w/v% $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.016w/v% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.012w/v% $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2$
20 Oを溶かしたもの)、 5×10^{-6} w/v% カナマイシンとした。

- ポリエステル生産培地の組成は、0.385w/v% $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.067w/v% KH_2PO_4 、0.291w/v% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1w/v% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5v/v% 微量金属塩溶液 (0.1N塩酸に1.6w/v% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1w/v% $\text{CaCl}_2 \cdot 2$
25 H_2O 、0.02w/v% $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.016w/v% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.012w/v% $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を溶かしたもの)、0.05w/v% BIOSPUREX200K (消泡剤: コグニスジャパン社製) とした。炭素源は、パーム核油を分別した低融点画分であるパーム核油オレインを用い、培養全期間を通じ、比基質供給速度がそれぞれ、0.08、0.09、

0.10 (g ; 油脂) \times (g ; 正味乾燥菌体重量)⁻¹ \times (h ; 時間)⁻¹となるように流加した。

比基質供給速度の制御の基本となる正味の乾燥菌体重量の増殖曲線については、予備実験として、パーム核油オレインを用いて培養上清中の油脂層の厚さを観察しながら流加速度を調整して培養した結果を用いて求めた。すなわち、予備実験における単位培養液量あたりの正味の乾燥菌体重量の変化のデータから、図1のように培養36時間目までを直線増殖とし、それ以降は単位培養液量あたりの正味の乾燥菌体重量は一定としたものを採用した。

図2及び表1には、図1で求めた正味の乾燥菌体重量の増殖曲線を用い、比基質供給速度を0.09 (g ; 油脂) \times (g ; 正味乾燥菌体重量)⁻¹ \times (h ; 時間)⁻¹に設定した場合の、パーム核油オレインの単位培養液量あたりの流加速度の理論値(点線)と、実際に以下の実施例で流加した油脂の単位培養液量あたりの流加速度の段階的な変化パターン(実線)を示した。

なお、図1, 2及び下記表1～8において、Lは、培養液量(培地、菌体、油脂の合計容量)1リットルあたりを示し、hは時間を示すものである。

表1

培養時間 (h)	油脂流加速度 ((g-oil/h)/L)	流加速度の段階的変化 ((g-oil/h)/L)
0	0.00	0.58
14	1.16	1.24
16	1.32	1.49
20	1.65	1.82
24	1.98	2.14
28	2.31	2.48
32	2.64	2.81
36	2.97	2.97
40	2.97	2.97
44	2.97	2.97
48	2.97	2.97
52	2.97	2.97
56	2.97	2.97
60	2.97	2.97

Red 13株のグリセロールストック (50 μ l) を種培地 (10 ml) に接種して24時間培養した後、3 Lの前培養培地を入れた5 Lジャーファーマンター (丸菱バイオエンジニアリング社製MDL-500型) に0.2 v/v%接種した。運転条件は、培養温度30°C、攪拌速度500 rpm、通気量1.8 L/minとし、pHは6.7~6.8の間でコントロールしながら28時間培養した。pHコントロールには7%水酸化アンモニウム水溶液を使用した。

ポリエステル生産培養は、6 Lの生産培地を入れた10 Lジャーファーマンター (丸菱バイオエンジニアリング社製MDL-1000型) に前培養種母を1.0 v/v%接種した。運転条件は、培養温度28°C、攪拌速度400 rpm、通気量3.6 L/minとし、pHは6.7から6.8の間でコントロールした。pHコントロールには14%水酸化アンモニウム水溶液を使用した。培養は60時間行い、培養16時間目以降4時間おきにサンプリングし、遠心分離によって菌体を回収し、メタノールで洗浄後、凍結乾燥し、乾燥菌体重量を測定した。

得られた乾燥菌体約1 gに100 mlのクロロホルムを加え、室温で一昼夜攪拌して、菌体内のポリエステルを抽出した。菌体残渣をろ別後、エバポレーターで総容量が約30 mlになるまで濃縮後、約90 mlのヘキサンを徐々に加え、ゆっくり攪拌しながら、1時間放置した。析出したポリエステルをろ別後、50°Cで3時間真空乾燥した。乾燥ポリエステルの重量を測定し、菌体内のポリエステル含量を算出した。

また、得られた乾燥ポリエステル約20 mgに2 mlの硫酸-メタノール混液 (15:85) と2 mlのクロロホルムを添加して密栓し、100°Cで140分間加熱することでポリエステル分解物のメチルエステルを得た。冷却後、これに1.5 gの炭酸水素ナトリウムを少しずつ加えて中和し、炭酸ガスの発生が止まるまで放置した。4 mlのジイソプロピルエーテルを添加してよく混合した後、遠心して、上清中のポリエステル分解物のモノマーユニットの組成をキャピラリーガスクロマトグラフィーにより分析した。ガスクロマトグラフは島津製作所社製GC-17A、キャピラリーカラムはGLサイエンス社製NEUTRA BOND-1 (カラム長25 m、カラム内径0.25 mm、液膜厚0.4 μ m) を用いた。温度条件は、初発温度100~200°Cまで8°C/分の速度で昇温、さら

に200～290℃まで30℃/分の速度で昇温した。

比基質供給速度の制御が共重合ポリエステルの組成比及び生産性に与える影響を表2に示した。

表2

5 **P(3HB-co-3HH)生産量(g/L)**

比基質供給速度	培養24-h	培養36-h	培養48-h	培養60-h
0.08	2	15	40	63
0.09	3	18	43	66
0.10	3	21	46	68

10

3HH含有率(mol%)

比基質供給速度	培養24-h	培養36-h	培養48-h	培養60-h
0.08	18.2	15.1	12.4	11.1
0.09	15.8	12.2	10.3	8.9
0.10	13.2	10.2	8.5	7.5

15

この結果から、比基質供給速度を低く制御するほど生産性は少し低下するが、共重合ポリエステル中の3HH含有率が向上する事がわかった。また培養中の発
20 泡は比基質供給速度の設定値が低いほど良好に抑制される様子が観察された。

(実施例2)

パーム核油オレインのかわりに大豆油を用いた以外は、実施例1と同様の培地・条件で培養を行い、表3に示す結果を得た。

25

表 3

P(3HB-co-3HH)生産量(g/L)

比基質供給速度	培養24-h	培養36-h	培養48-h	培養60-h
0.08	2	33	55	62
0.09	4	39	60	64
0.10	3	41	60	68

3HH含有率(mol%)

比基質供給速度	培養24-h	培養36-h	培養48-h	培養60-h
0.08	13.2	6.7	5.3	4.1
0.09	12.9	5.8	4.2	3.4
0.10	13.8	4.9	3.3	3.2

- 表3に示されているように、大豆油でもパーム核油オレインと同様に比基質供給速度を低く制御する事によって、ポリエステル中の3HH含有率が向上する事がわかった。しかしながら、同じ比基質供給速度条件下での3HH含有率を大豆油と実施例1のパーム核油オレインで比較すると、大豆油の方が明らかに低く、基質として使用する油脂の違いによって、同じように比基質供給速度を同じ値に制御しても得られる3HH含有率に差があることがわかった。

発泡については、実施例1と同様に比基質供給速度の設定値が最も低い0.08 (g ; 油脂) × (g ; 正味乾燥菌体重量)⁻¹ × (h ; 時間)⁻¹に制御した時に良好に抑制された。

25 (実施例3)

基質としてパーム核油オレインのかわりに、コーン油、綿実油、パームWオレイン油、パーム核油、ヤシ油、落花生油を用い、比基質供給速度をそれぞれの油脂について、0.06 (g ; 油脂) × (g ; 正味乾燥菌体重量)⁻¹ × (h ; 時間)⁻¹及び0.12 (g ; 油脂) × (g ; 正味乾燥菌体重量)⁻¹ × (h ; 時間)⁻¹

)⁻¹に制御した以外は、実施例1と同様の培地・条件で培養を行い、表4に示す結果を得た。表4には、比基質供給速度がポリエステルの生産性及び3HH含有率に与える影響をそれぞれの油脂についてまとめた(培養60時間目の結果のみ比較した)。

5 表4

油脂	比基質供給速度 0.06		比基質供給速度 0.12	
	P(3HB-co-3HH) 生産量 (g/L)	3HH 含有率 (mol%)	P(3HB-co-3HH) 生産量 (g/L)	3HH 含有率 (mol%)
コーン油	63	3.2	68	2.7
綿実油	48	3.3	52	2.7
パームWオレイン油	60	3.3	62	3
パーム核油	45	7	48	6.8
ヤシ油	41	13.8	43	13.5
落花生油	43	5.2	45	4.6

表4に示されているように、いずれの油脂においても比基質供給速度を低く制御する事によって、生産性は少し低下するが共重合ポリエステル中の3HH含有率が向上する事がわかった。また培養60時間目で到達する3HH組成については、基質として使用する油脂の違いによって、比基質供給速度を同じ値に制御しても明らかな差が認められ、ラウリン系の油脂であるヤシ油、パーム核油では、約7~14mol%の比較的高い3HH含有率を有するP(3HB-co-3HH)が得られ、コーン油、綿実油、パームWオレイン油、落花生油では、約3~6mol%の比較的低い3HH含有率を有するP(3HB-co-3HH)が得られることがわかった。表4の結果は、油脂の種類あるいは比基質供給速度の設定値を選択し、両者を適切に組み合わせることにより、高い生産性を確保しながら、所望の3HH含有率を有する共重合ポリエステルを得ることが可能となることを示している。

(実施例4)

15 基質としてパーム核油オレインと大豆油の混合油3種類、つまり、混合油A(パーム核油オレイン/大豆油=75/25(v/v))、混合油B(パーム核油オレイン/大豆油=50/50(v/v))、混合油C(パーム核油オレイン/大豆油=25/75(v/v))を用いた以外は、実施例1と同様の培地・条件で培養を行い、表5~7に示す結果を得た。表5~7には比基質供給速度がポリエステル

20 エステルの生産性及び3HH含有率に与える影響をそれぞれの混合油脂についてまとめた。

表 5

混合油A(パーム核油オレイン/大豆油=75/25(v/v))

P(3HB-co-3HH)生産量(g/L)

比基質供給速度	培養 24-h	培養36-h	培養48-h	培養60-h
0.08	3	16	39	64
0.09	2	20	44	66
0.10	3	23	48	69

3HH含有率(mol%)

比基質供給速度	培養 24-h	培養36-h	培養48-h	培養60-h
0.08	16.9	13.8	11.1	10.3
0.09	14.1	10.8	8.6	7.5
0.10	11	8.6	7.5	7

表 6

混合油B(パーム核油オレイン/大豆油=50/50(v/v))

P(3HB-co-3HH)生産量(g/L)

比基質供給速度	培養24-h	培養36-h	培養48-h	培養60-h
0.08	2	15	37	65
0.09	3	21	42	66
0.10	2	22	48	70

3HH含有率(mol%)

比基質供給速度	培養24-h	培養36-h	培養48-h	培養60-h
0.08	15.9	12.6	10.2	8.1
0.09	13.6	9.8	7.9	6.8
0.10	9.9	7.4	6.8	6.3

表 7

混合油C(パーム核油オレイン/大豆油=25/75(v/v))

P(3HB-co-3HH)生産量(g/L)

比基質供給速度	培養24-h	培養36-h	培養48-h	培養60-h
0.08	3	12	36	66
0.09	3	23	43	66
0.10	4	23	47	68

3HH含有率(mol%)

比基質供給速度	培養24-h	培養36-h	培養48-h	培養60-h
0.08	12.1	9.2	7.2	6.3
0.09	11.6	8.3	6.2	5.7
0.10	8.7	6.8	5.8	5.2

15

表5～7に示されているように、いずれの混合油脂においても比基質供給速度を低く制御する事によって、生産性は少し低下するがポリエステル中の3HH含有率が向上する事がわかった。また、3HH含有率については、混合油中のパーム核油オレインの割合が多いほど高くなることがわかった。これは、表5～7、及び、パーム核油オレイン、大豆油がそれぞれ100%の場合(実施例1の表2、実施例2の表3)を合わせた結果からとも言えることである。表5～7に示された結果は、実施例3で示された油脂の種類と比基質供給速度制御値を組み合わせることに加え、複数の油脂を混合する、さらにはその混合割合を調整することにより、高い生産性を確保しながら、所望の3HH含有率を有するポリエステルを得ることが可能となることを示している。

(実施例5)

パーム核油オレインを炭素源とし、菌体増殖期である培養36時間目までは比基質供給速度を $0.09 \text{ (g ; 油脂)} \times \text{(g ; 正味乾燥菌体重量)}^{-1} \times \text{(h ;$

時間)⁻¹に、その後のポリエステル蓄積期である培養36時間目以降は0.08 (g ; 油脂) × (g ; 正味乾燥菌体重量)⁻¹ × (h ; 時間)⁻¹に制御した以外は、実施例1と同様にして培養を行った。

表 8

	培養24-h	培養36-h	培養48-h	培養60-h
P(3HB-co-3HH)生産量(g/L)	3	17	42	65
3HH含有率(mol%)	16.0	13.0	12.5	12.3

- 10 表8に示された結果を、実施例1の表2に示された結果と比較するとわかるように、ポリエステル蓄積期に比基質供給速度を少し下げて培養することにより、培養全期間を通じて0.09 (g ; 油脂) × (g ; 正味乾燥菌体重量)⁻¹ × (h ; 時間)⁻¹に制御した場合に比べて、生産性を低下させることなく、培養全期間を通じて0.08 (g ; 油脂) × (g ; 正味乾燥菌体重量)⁻¹ × (h ; 時間)⁻¹に制御した場合と同等以上の高3HH含有率を得ることができた。

産業上の利用可能性

- 本発明の方法において、炭素源として用いる油脂の比基質供給速度の制御値を選択することによって、さらには、油脂の比基質供給速度の制御値と油脂の種類を適切に組み合わせることによって、生分解性ポリマーである共重合ポリエステルの物性を大きく変化させる同ポリエステルの組成を任意に制御できるようになり、かつ高い生産性を安定して得ることが可能となる。したがって、応用範囲の広い共重合ポリエステルを、低コストで工業的に生産、提供できるようになる。加えて、比基質供給速度を制御することにより、油脂の過剰供給に起因する発泡を良好に抑制でき、培養の安定化が図れる。

請求の範囲

1. 微生物による共重合ポリエステルの生産において、炭素源として使用する油脂の比基質供給速度を、培養の全期間を通じて一定値に制御することを特徴とする培養方法。
2. 微生物による共重合ポリエステルの生産において、炭素源として使用する油脂の比基質供給速度を、培養の菌体増殖期とポリエステル蓄積期とで変化させ、それぞれ期間中は一定値に制御することを特徴とする培養方法。
3. 油脂の種類及び／又は油脂の比基質供給速度の制御値を選択することによって、生産される共重合ポリエステルの組成をコントロールすることを特徴とする請求の範囲第1又は2項記載の培養方法。
4. 炭素源として使用する油脂が、大豆油、コーン油、綿実油、パーム油、パーム核油、ヤシ油、落花生油、及び、これらの油脂を分別して得られる分別油脂の中から選ばれる少なくとも1種の油脂を含む油脂である請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の培養方法。
5. 炭素源として使用する油脂が、その構成脂肪酸としてラウリン酸を含む油脂であり、かつリン制限下で培養することを特徴とする請求の範囲第1～4項のいずれかに記載の培養方法。
6. 微生物が、ラルストニア (Ralstonia) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、アエロモナス (Aeromonas) 属、アルカリゲネス (Alcaligenes) 属、及び、エシェリキア (Escherichia) 属からなる群から選択される属に属する微生物である請求の範囲第1～5項のいずれかに記載の培養方法。

7. 微生物が、ポリエステル重合酵素遺伝子を組み込まれた形質転換微生物である請求の範囲第1～6項のいずれかに記載の培養方法。
8. 共重合ポリエステルが、3-ヒドロキシヘキサン酸を含む共重合ポリエス
- 5 テルである請求の範囲第1～7項のいずれかに記載の培養方法。

1 / 1

図 1

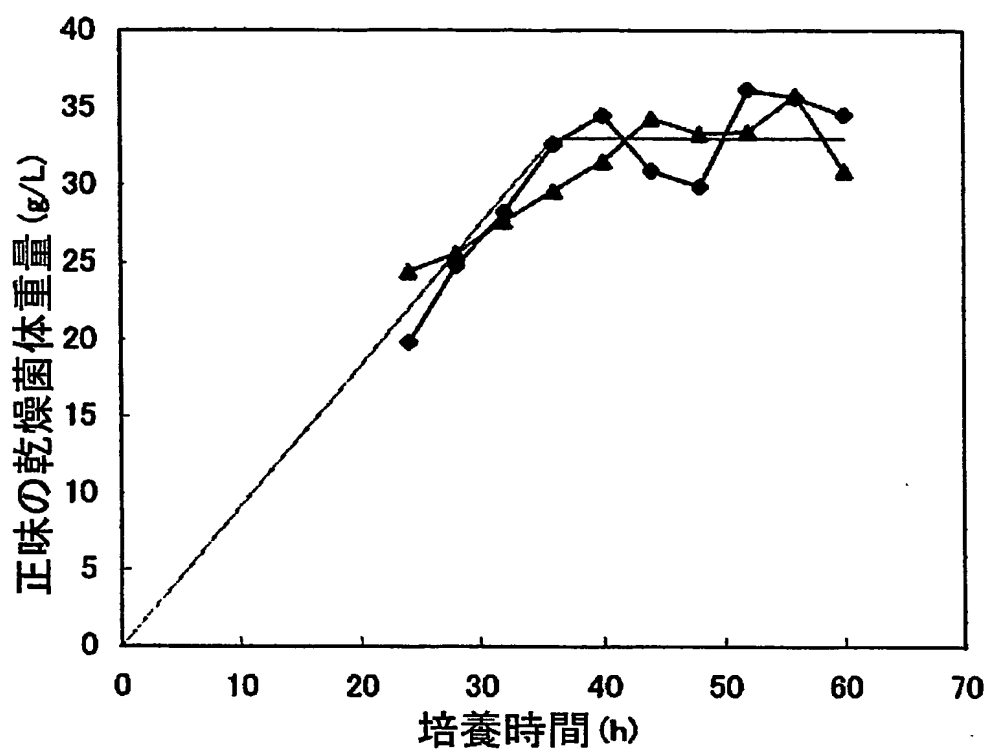
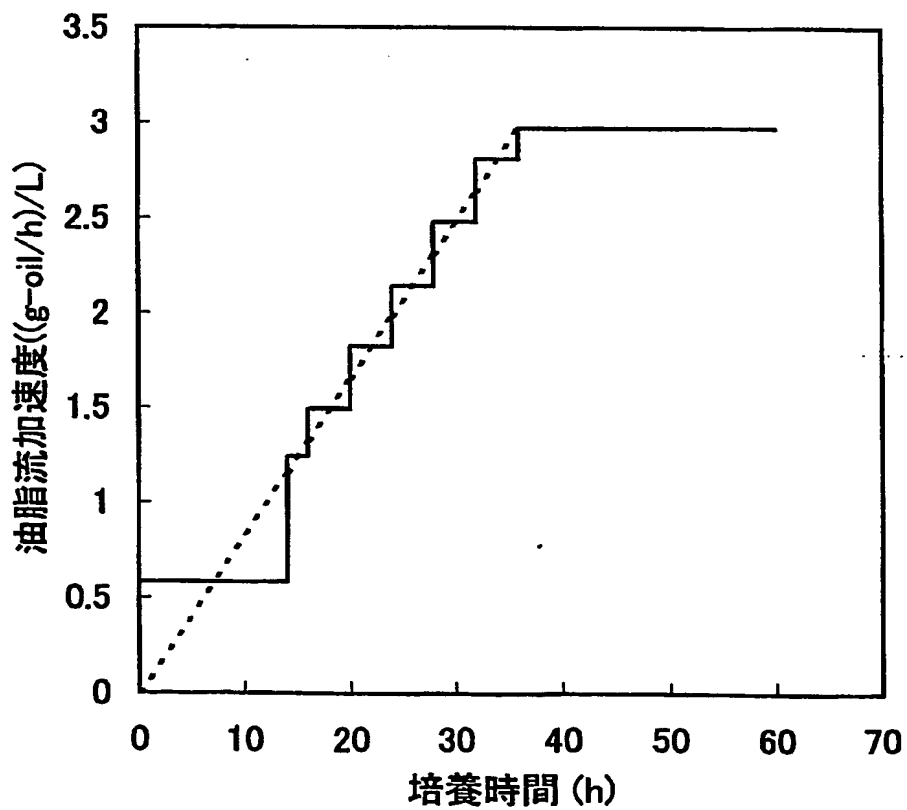


図 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/13022

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N1/20, C12N1/21, C12P7/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N1/20, C12N1/21, C12P7/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{X}{Y}$	JP 2001-340078 A (Kaneka Corp.), 11 December, 2001 (11.12.01), (Family: none)	$\frac{1, 3, 4, 6-8}{2, 5}$
Y	JP 08-289797 A (Research Institute of Innovative Technology for the Earth), 05 November, 1996 (05.11.96), (Family: none)	1-8
$\frac{X}{Y}$	JP 07-155192 A (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.), 20 June, 1995 (20.06.95), (Family: none)	$\frac{1}{2-8}$
$\frac{X}{Y}$	JP 64-027483 A (Shoichi SHIMIZU), 30 January, 1989 (30.01.89), (Family: none)	$\frac{1, 2}{3-8}$

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 18 November, 2003 (18.11.03)	Date of mailing of the international search report 02 December, 2003 (02.12.03)
---	--

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13022

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	Seung hwan Lee et al., Production of poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of Aeromonas hydrophilia., Biotechnol.Bioeng. (2000), Vol.67, No.2, pages 240 to 244	<u>5</u> 1-4,6-8
<u>Y</u> A	G.Q. Chen et al., Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)., Appl.Microbiol.Biotechnol. (2001), Vol.57, No.1/2, pages 50 to 55	<u>5</u> 1-4,6-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N1/20, C12N1/21, C12P7/62

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N1/20, C12N1/21, C12P7/62

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	JP 2001-340078 A (鐘淵化学工業株式会社) 2001. 12. 11 (ファミリーなし)	<u>1, 3, 4, 6-8</u> 2, 5
Y	JP 08-289797 A (財団法人地球環境産業技術研究機構) 1996. 11. 05 (ファミリーなし)	1-8
<u>X</u> Y	JP 07-155192 A (三菱瓦斯化学株式会社) 1995. 6. 20 (ファミリーなし)	<u>1</u> 2-8

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 11. 03

国際調査報告の発送日

02.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 美葉子

印

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	JP 64-027483 A(清水祥一)1989. 01. 30 (ファミリーなし)	<u>1、 2</u> 3 - 8
<u>Y</u> A	Seung hwan Lee, et. al., Production of poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of Aeromonas hydrophilia., Biotechnol. Bioeng. (2000), Vol. 67, No. 2, p. 240-244	<u>5</u> 1-4, 6-8
<u>Y</u> A	G. Q. Chen, et. al., Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate -co-3-hydroxyhexanoate)., Appl. Microbiol. Biotechnol. (2001), Vol. 57, No. 1/2, p. 50-55	<u>5</u> 1-4, 6-8